

4
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/04517
06.07.00

REC'D 25 AUG 2000
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 7月 8日

JP00/4517

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第195104号

18/1

出願人
Applicant(s):

株式会社ヘリックス研究所

#2

10/019335

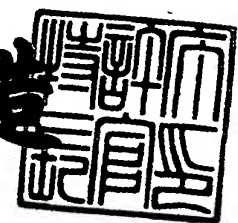
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月11日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3062532

【書類名】 特許願

【整理番号】 H1-102

【提出日】 平成11年 7月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県藤沢市辻堂新町 1-2-7-105

 【氏名】 太田 紀夫

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市高柳 1473-4-202

 【氏名】 若松 愛

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町大室 511-12

 【氏名】 磯貝 隆夫

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市木更津 2-8-1-201

 【氏名】 斎藤 薫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金 2-7-23

 【氏名】 鈴木 穰

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都杉並区南荻窪 4-8-13

 【氏名】 菅野 純夫

【特許出願人】

 【識別番号】 597059742

 【氏名又は名称】 株式会社ヘリックス研究所

 【代表者】 永山 治

【代理人】

 【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 完全長cDNAライブラリーの作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 cDNAライブラリーを作製する方法であって、

(a) mRNAおよびそれ以外のRNAを含むRNA試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端にリン酸基を有する不完全長mRNA分子の該リン酸基を除去する工程、

(b) 工程(a)の処理後のRNA試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端にCAP構造を有する完全長mRNAの該CAP構造をリン酸基に変換する工程、

(c) 工程(b)の処理後のRNA試料をRNAリガーゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端のCAP構造をリン酸基に変換されたmRNAの5'末端に合成オリゴRNA(オリゴキャップリンカー)を結合させる工程、

(d) 工程(c)の処理後のRNA試料からポリA RNAを選択する工程、および

(e) 工程(c)において使用した合成オリゴRNAもしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴdTアダプターをプライマーとして、工程(d)において選択したポリA RNAを鋳型に逆転写反応を行う工程、を含む方法。

【請求項 2】 工程(a)において用いるアルカリ性ホスファターゼが細菌由来のアルカリ性ホスファターゼ(BAP)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】 工程(b)において用いる酸性ピロホスファターゼがタバコ由来の酸性ピロホスファターゼ(TAP)である、請求項1または2に記載の方法

【請求項 4】 工程(a)におけるRNA試料が全RNA(total RNA)である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 工程(b)における酸性ピロホスファターゼ処理をpH6.0より高くpH8.0以下の条件で行う、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 請求項1から5のいずれかに記載の方法により作製されるcDNAライブラリー。

【請求項 7】 ゲノム上の遺伝子のプロモーターを含む転写制御領域を単離

する方法であって、

(a) 請求項 6 に記載の cDNA ライブラリーに含まれる cDNA の塩基配列を決定する工程、

(b) 決定した塩基配列と対応するゲノム DNA の塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、

(c) 特定した転写開始点の上流のゲノム DNA 断片を単離する工程、を含む方法

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、cDNA ライブラリーの作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

完全長 cDNA クローンは、遺伝子の転写産物や翻訳産物の一次構造を明らかにしたり、遺伝子の機能を実証的に解析するための重要なツールである。即ち、完全長 cDNA には、その翻訳産物たるタンパク質の一次配列の全ての情報が含まれるため、その構造の解析により、コードするタンパク質の構造を容易に予測することが可能である。また、完全長 cDNA を持ちいれば、適当な発現系を適用して、それがコードするタンパク質を大量に生産したり、適当な細胞系へ導入することによりその機能を生物活性として解析したりすることも可能となる。

【0003】

完全長 cDNA を効率よく取得するためには、完全長 cDNA ライブラリーが有用である。ところが一般的な方法で作製した cDNA ライブラリーからは、完全長 cDNA を効率よく取得することは非常に困難である。cDNA ライブラリーの作製法として、比較的長い cDNA クローンが得やすいことから現在最も一般的となっている Gubler と Hoffman の方法 (Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25: 263-269) では、第一鎖にアニールしている mRNA に切れ目を入れ、それをプライマーとして第二鎖 cDNA 合成を行っているため、原理的に mRNA の 5' 末端部分の cDNA を合成することがで

きない。また、Okayama-Bergの方法(Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Biotechnology* 24:210-219)では、ベクター配列から第二鎖cDNA合成のプライミングをするので、理論的にはmRNAの5'末端部分のcDNAを取得することが可能である。しかし、この方法では長いcDNAの取得は難しく、クローン化効率も悪いと言われている。また、より重大な問題として、生体試料から抽出したmRNAには、分解が進んだ不完全長のmRNAがかなりの比率で含まれている。これらの方法では、このような分解したmRNA分子由来の不完全長cDNAも一緒に合成されてしまうため、高い完全長率のcDNAライブラリーを作製することはできない。こうして合成された大量の不完全長cDNAと完全長のmRNAから合成されたcDNAを識別することは、実質的に不可能である。

【0004】

これまでに、完全長cDNAを効率よく取得するためのいくつかの方法が報告されている。完全長cDNAを効率よく取得するためには、真核細胞のmRNAの5'末端に特異的な構造であるCAP構造を認識して分子を選別することが有効である。菅野らは、このCAP構造を特異的に認識してそれを合成オリゴヌクレオチドと置換する「オリゴキャップ法」を開発した(K. Maruyama and S. Sugano, (1994) *Gene* 138: 171-174; Y. Suzuki et al., (1997) *Gene* 200: 149-156; 鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」(羊土社) pp.46-51)。また、林崎らは、CAP構造をビオチン分子で特異的に標識する方法を開発した(P. Carninci et al., (1996) *Genomics* 37: 327-336; P. Carninci et al., (1996) *DNA Research* 4: 61-66)。その他、「オリゴキャップ法と岡山-バーグ法を組み合わせた方法」(S. Kato et al., (1994) *Gene* 150: 243-250)、「リンカー化学結合法 (Genset法)」(Merenkova, N. et al. Method for the specific coupling of the CAP of the extremity 5' of a fragment mRNA and preparation of complete cDNA. PCT/FR96/00651, 1996)などが開発されている。いずれの方法でも、原理的に完全長mRNA分子由来のcDNAクローン選択的に集めてくることができる。現在、これらの方法に基づいて、完全長cDNAを多く含むcDNAライブラリーを構築することが可能となっている。

【0005】

ところがいずれの方法においても、一般的なcDNAライブラリー作製法に比べてより多くの出発材料を必要とする。報告されているプロトコールでは、最低でもオリゴキャップ法ではポリA RNAとして約5~10 μ g(Y. Suzuki et al., (1997) Gene 200: 149-156; 鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」 (羊土社) pp.46-51)、キャップトラップ法ではポリA RNAとして約5 μ g(P. Carninci et al., (1996) Genomics 37: 327-336; P. Carninci et al., (1996) DNA Research 4: 61-66)のRNA試料を必要とする。また、出発材料として供与できるRNA試料量が少ない場合、結果として得られるcDNAの完全長率が顕著に低下したり、得られるクローンタイターが低下するといった技術的な問題点を有していた。従って、少量の生体材料しか得られないといった制約がある場合、従来の方法で完全長率の高いcDNAライブラリーを作製することは、非常に困難な状況にあった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、少ないRNA試料を出発材料とした場合でも完全長率の高いcDNAライブラリーを作製する方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

従来のオリゴキャップ法では、以下の原理に基づき、完全長mRNAの5'末端から3'末端までの全長部分を多く含むcDNAライブラリーを作製していた(図1参照)。即ち、まず、

① mRNA試料をバクテリアアルカリ性ホスファターゼ(BAP)で処理して不完全長のmRNA分子の5'末端のリン酸基を取り除く。これにより5'CAP構造を有する完全長mRNA以外のmRNAの5'端をすべて水酸基に変換する。

②バクテリアアルカリ性ホスファターゼ(TAP)処理を行って完全長mRNAの5'末端のCAP構造をリン酸基に変換する。これにより完全長mRNAのみが5'端にリン酸基を有することになる。

③ RNAリガーゼを用いて、完全長mRNAの5'末端に合成オリゴRNA(オリゴキャップリンカー)を結合させる。これにより5'端にリン酸基を有する完全長mRNAのみが、その5'端に合成オリゴRNAが付加されることになる。

④オリゴキャップリンカーを付加したmRNAを鋳型として第一鎖cDNAを合成した後、オリゴキャップリンカー中の配列とオリゴdTアダプターをプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応を行う。これにより完全長mRNAに対応するcDNAのみが増幅されることになる。

【0008】

本発明者らは、このようにして作製したオリゴキャップライブラリーから得られたcDNAクローンの大量解析を行った。ところが、この方法で作製したcDNAライブラリーの全長率は約60～75%であることが判明した(T. Ota et al., (1998) *Microbial and comparative genomics*, 3:C-87)。cDNAライブラリーごとのクローンタイターと全長率は用いた出発材料の量や質に大きく依存しており、少量の出発材料から作製したcDNAライブラリーの場合には、クローンタイターが低下するだけでなく、完全長率も著しく低下する傾向が認められた。

本発明者らは、オリゴキャップ法におけるライブラリーの全長率の低下の原因として、2つの原因を考えた。即ち、一つは不完全長mRNAの5'末端の脱リン酸化を行うバクテリアアルカリ性ホスファターゼ反応の不十分さであり、もう一つはバクテリアアルカリ性ホスファターゼ反応後におこる5'末端にリン酸基を生じるmRNAの分解である(上記工程①)。いずれの原因によっても、RNAリガーゼを用いたオリゴキャップリンカーの付加反応において、元々のRNAのCAP構造の有無とは関係なく分解した不完全長のmRNA分子の5'末端にオリゴキャップリンカーが付加されてしまい、その結果としてライブラリーとしての完全長率が低下してしまう。

【0009】

一方、クローンタイターの低下は、タバコ酸性ピロホスファターゼによる脱キャップ反応の不十分さやRNAリガーゼによるオリゴキャップリンカーの付加反応の不完全さが原因になって引き起こされるものと考えた(上記工程②)。

【0010】

ライブラリーの完全長率が使用する出発材料の量に大きく依存することから、本発明者らは、試料の状態や量に応じたオリゴキャッピング反応の各段階の反応条件の至適化、特にmRNAの分解を最小限に抑制する条件の設定が必要であると考

えた。作製したcDNAライブラリーの全長率を正確に評価するためには、作製したライブラリーから得られるある程度まとまった数のクローンの配列の解析を行う必要があるが、ライブラリー作製時の多段階の反応条件を検討しながら、得られたcDNAライブラリーの完全長率を評価し、その結果をフィードバックしていくことは非常に効率が悪い。

そこで、本発明者らは、効率よくオリゴキャップ法の各段階の反応条件の最適化やプロトコルの改善を図るため、ジゴキシゲニン(DIG)標識した合成オリゴRNAを用いてオリゴキャッピング反応生成物を高感度に可視化する系を開発した。これによりオリゴキャップ法の際の各段階の反応状態やRNAの状態を迅速かつ高感度に評価できるようにした。

そして、この評価系を用いてオリゴキャップ反応の基質であるmRNAの状態や各段階の反応の進行度を的確に評価することにより、mRNAの分解を最小限に抑制したプロトコルへの見直し、ならびにアルカリ性ホスファターゼ反応、酸性ピロフォスファターゼ反応、およびRNAリガーゼの各段階の反応条件の最適化を図った。その結果、本発明者らは、上記各段階の反応工程におけるRNA試料を、従来から用いられてきたpoly A RNAから全RNAへ変更することによりmRNAの分解を最小限に抑制すると共に、酸性ピロフォスファターゼ反応における反応液のpHを上昇させることによりmRNAの脱キャップ反応の効率を高めることができることを見出した。これにより、従来の方法に比べてはるかに少ない量の出発材料からでも非常に高い完全長率のcDNAライブラリーを作製することが可能となる新しいプロトコルの開発に成功した。

【0011】

即ち、本発明は、少ないRNA試料を出発材料とした場合でも完全長率の高いcDNAライブラリーを作製しうるオリゴキャップ法に関し、より具体的には、

- (1) cDNAライブラリーを作製する方法であって、
 - (a) mRNAおよびそれ以外のRNAを含むRNA試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端にリン酸基を有する不完全長mRNA分子の該リン酸基を除去する工程、
 - (b) 工程(a)の処理後のRNA試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該R

NA試料に含まれる5'末端にCAP構造を有する完全長mRNAの該CAP構造をリン酸基に変換する工程、

(c) 工程(b)の処理後のRNA試料をRNAリガーゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端のCAP構造をリン酸基に変換されたmRNAの5'末端に合成オリゴRNA(オリゴキャップリンカー)を結合させる工程、

(d) 工程(c)の処理後のRNA試料からポリA RNAを選択する工程、および

(e) 工程(c)において使用した合成オリゴRNAもしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴdTアダプターをプライマーとして、工程(d)において選択したポリA RNAを鋳型に逆転写反応を行う工程、を含む方法、

(2) 工程(a)において用いるアルカリ性ホスファターゼが細菌由来のアルカリ性ホスファターゼ(BAP)である、(1)に記載の方法、

(3) 工程(b)において用いる酸性ピロホスファターゼがタバコ由来の酸性ピロホスファターゼ(TAP)である、(1)または(2)に記載の方法、

(4) 工程(a)におけるRNA試料が全RNA(total RNA)である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 工程(b)における酸性ピロホスファターゼ処理をpH6.0より高くpH8.0以下の条件で行う、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、

(6) (1)から(5)のいずれかに記載の方法により作製されるcDNAライブラリー、

(7) ゲノム上の遺伝子のプロモーターを含む転写制御領域を単離する方法であって、

(a) (6)に記載のcDNAライブラリーに含まれるcDNAの塩基配列を決定する工程、

(b) 決定した塩基配列と対応するゲノムDNAの塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、

(c) 特定した転写開始点の上流のゲノムDNA断片を単離する工程、を含む方法、を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のcDNAライブラリーの作製方法においては、まず、mRNAおよびそれ以外のRNAを含むRNA試料をアルカリ性ホスファターゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端にリン酸基を有する不完全長mRNA分子の該リン酸基を除去する（工程（a））。

【0013】

従来のオリゴキャップcDNAライブラリーの完全長率を低下させる原因としては、アルカリ性ホスファターゼ反応の不十分さやアルカリ性ホスファターゼ処理後のmRNAの分解が考えられた。本発明の方法は、RNA試料としてmRNA以外のRNAを含むRNA試料を用いてオリゴキャッピング反応を行うことを特徴とし、これにより従来の方法で完全長率の低下の大きな原因となっていた反応中におけるmRNAの分解を顕著に抑制することができる。このmRNAの分解の抑制は、RNA試料に含まれるmRNA以外のRNAが、酵素標品に含まれるRNA分解活性に対するmRNAの競合的な基質となることによる、cDNAの鋳型とするmRNAの分解の相対的な抑制であると考えられる。

【0014】

本発明の方法に用いる「mRNA以外のRNA」としては、例えば、リボソームRNA、polyAを持たないRNA分子、および合成RNAが挙げられる（本発明においては、polyAを持たないRNA分子も「mRNA以外のRNA」に含まれる）。本発明において用いるRNA試料は、細胞から直接調製された全RNAであってもよく、また、調製したmRNA試料に対し他のRNAを混合して調製したものであってもよい。

【0015】

本発明の方法に用いられるアルカリ性ホスファターゼとしては、その由来に特に制限はなく、例えば、細菌由来のもの（BAP）、Calf intestine、shrimp由来のものなどが用いられる。反応条件は、脱リン酸反応が達成される条件であれば特に制限はない。例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNAクローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件にて反応を行なうことができる。

【0016】

本発明の方法においては、次いで、工程（a）の処理後のRNA試料を酸性ピロホスファターゼで処理して、該RNA試料に含まれる5'末端にCAP構造を有する完全

長 mRNA の該 CAP 構造をリン酸基に変換する（工程（b））。

【0017】

本発明の方法に用いられる酸性ピロホスファターゼとしては、その由来に特に制限はなく、例えば、タバコ由来のもの（TAP）を好適に用いることができる。酸性ピロホスファターゼ反応においては、反応を pH6.0 より高く 8.0 以下の条件で行うと好ましい。これにより従来のように pH5.5 で行う場合と比較して、mRNA の脱キャップ反応の効率を飛躍的に向上させることができる。

【0018】

本発明の方法においては、次いで、工程（b）の処理後の RNA 試料を RNA リガーゼで処理して、該 RNA 試料に含まれる 5' 末端の CAP 構造をリン酸基に変換された mRNA の 5' 末端に合成オリゴ RNA（オリゴキャップリンカー）を結合させる（工程（c））。

用いられる RNA リガーゼとしては、例えば、T4 フェージ酵素を好適に用いることができる。RNAase の混入を防止するために、例えば、T4 フェージ酵素の遺伝子を RNase が欠損した大腸菌（A19）にクローン化した組換え体から調製した酵素を用いてもよい。リガーゼ反応の反応条件は、RNA の 3' 水酸基と RNA の 5' リン酸基を連結することができる反応条件であれば特に制限はなく、例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNA クローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件にて反応を行なうことができる。リガーゼ反応に用いる合成オリゴ RNA としては、特に制限はない。

【0019】

本発明の方法においては、次いで、工程（c）の処理後の RNA 試料からポリ A RNA を選択する（工程（d））。ポリ A RNA の選択方法としては一般的に行われている方法、例えば、オリゴ dT セルロースカラムあるいはオリゴ dT ラテックスを用いて選択する方法などにより、好適に行うことができる。

【0020】

本発明の方法においては、次いで、工程（c）において使用した合成オリゴ RNA もしくはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドおよびオリゴ dT アダプターをプライマーとして、工程（d）において選択したポリ A RNA を鋳型に逆転写反応

を行う（工程（e））。

逆転写反応の反応条件は、選択する酵素などにより変動しうるが、例えば、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNAクローニング」（羊土社）pp.46-51」に記載の条件で反応を行なうことができる。

【0021】

本発明の方法によれば、5'-端の全量率が非常に高いcDNAライブラリーを効率的に作製することができる。これにより転写開始点を容易に特定でき、転写開始点が特定できれば、それぞれのmRNAに対応する染色体DNAの転写上流領域（プロモーターを含む転写制御領域）をクローニングすることができる。完全長cDNAクローン、及び完全長cDNAクローンの5'末端の配列情報からは、実験的にもコンピューター上の解析でも、容易にゲノムのプロモーター領域を含む転写制御領域の断片を取得、あるいはその情報を得ることが可能である。

【0022】

従って、本発明は、また、上記本発明のcDNAライブラリーの作製方法によって作製されたcDNAを利用し、ゲノム上の遺伝子の発現制御領域を単離する方法を提供する。この方法は、（a）上記本発明のcDNAライブラリーの作製方法によって作製されたcDNAライブラリーに含まれるcDNAの塩基配列を決定する工程、（b）決定した塩基配列と対応するゲノムDNAの塩基配列とを比較し、ゲノム上の転写開始点を特定する工程、および（c）特定した転写開始点の上流のゲノムDNA断片を単離する工程、を含む方法によって実施することができる。

【0023】

「転写調節領域の単離」および「転写制御因子の同定と精製」については、「細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル」（東京大学医科学研究所制癌研究部編 秀潤社1993年）のp352-398に記載がある。該文献に記載の方法は転写開始点の特定にS1マッピング法等を用いているが、本発明の方法をもちいれば、5'-端の全量率が非常に高いcDNAライブラリーが作製できるため、転写開始点の特定がかなり容易になる。

【0024】

部位特異的に発現している遺伝子の情報を精度良く取得するためには、できる

だけ限定された領域で発現している遺伝子の解析を行なうことが必要である。ところが、従来の方法では大量の試料からしか完全長cDNAライブラリーを作製することができなかったため、周辺部位で発現している遺伝子に由来する情報が混在してしまい、正確な部位特異な発現情報を解析することは困難であった。本法により、少量の生体試料からも完全長率の高いcDNAライブラリーを作製することができるようになった。つまり、この方法によってより限定された組織切片から作製した完全長cDNAライブラリーを基に、部位特異的に発現している遺伝子の転写開始点の情報を精度よく得ることが容易になった。

【0025】

最近の染色体DNAとcDNAの関係、実験法、コンピューター解析法については、「Genome Analysis: A Laboratory Manual volume 1-4」(Cold Spring Harbor Laboratory Press, volume 1: 1997年, volume 2: 1998年, volume 3-4: 1999年)や「Methods in Enzymology 303巻, Section II. Gene Identification」(Academic Press, 1999年, p77-161)に記載がある。これら文献に記載の方法をもちいれば、cDNAの5'-端配列より転写開始点上流領域がクローニングできる。

【0026】

さらに、ヒトゲノムプロジェクトでは、ヒトゲノムのクローン化されたBAC (Bacterial artificial chromosome) クローンを染色体にマップし、それぞれのBACクローンの配列解析を行うことにより全ゲノム配列解析を完了する計画で進行している。したがって、mRNAの5'-端配列が特定できれば、約150 kbのヒトゲノムがクローン化されたBACクローンでの転写開始領域の特定もヒト染色体について可能となる。

【0027】

本発明の方法は、例えば、以下のように実施することができる。各種臓器や細胞より、本発明の方法でcDNAライブラリーを作製する。各cDNAクローンについて、5'-端の配列をワンパス配列解析法によりDNAシーケンサーで解析する（通常は数百塩基解析できる）。次いで、転写制御領域の単離を行なう。これには、in silicoにより転写制御領域を検索する方法と実験的に転写制御領域をクローニングする方法とがある。まず前者の方法は、それぞれのcDNAクローンの5'-端配

列について公共データベース中のゲノム配列等とBLAST解析 [S. F. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)] によりヒットする配列を検索する。ヒットする配列が存在する場合は、その上流配列数kb程度（通常は1-2 kbで十分である）までを取得できれば、転写制御領域の配列が取得されたことになる。後者の方法としては、それぞれのcDNAの5'-端配列をプローブとして、ゲノムDNAのクローン化されたBACクローンからクローニングしてくる方法等がある。

【0028】

もっと容易には次に示す方法がある。J. M. Valdesら [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:5377-5381 (1994)] は、ヒトゲノムをクローン化したYAC (yeast artificial chromosome) やコスミドクローンから、転写開始点前後に存在することがあるCpG islandを基点にして、その前後のゲノムDNAをクローニングする方法を開発している。CpG islandの配列のかわりにcDNAの5'-端配列をもちいれば、より特異的に転写制御領域が取得できる。この時の鋳型としては、YACやコスミドでなければならないわけではない。BACクローンを用いることも可能である。

【0029】

転写制御領域をクローニングする目的の場合には、本発明の方法におけるcDNAライブラリー作製時に、mRNAの3'-側のプライマーとしてオリゴdTプライマーのかわりにY. Suzukiら [Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)] に記載のランダムアダプタープライマー (random-adaptor primer) を用いることもできる。

【0030】

【実施例】

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0031】

【実施例1】 ジゴキシゲニン (DIG) 標識合成オリゴRNAを用いたオリゴキャッピング反応の評価法

cDNAライブラリーの全長率を正確に評価するためには、ライブラリーから得られたある程度まとまった数のクローンの配列を解析する必要がある。したがって

、その結果をフィードバックしながら多段階に及ぶ各ステップの反応条件を最適化していくことは、きわめて効率が悪い。そこで本発明では、まずDIG標識した合成オリゴRNAを用いてオリゴキャッピング反応を行うことにより、オリゴキャッピング反応生成物を高感度に可視化する系を開発した。

合成オリゴRNA KM02 (配列 5' - AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UGG - 3' / 配列番号: 1) の5'末端をDIG(ベーリンガー・マンハイム社)で標識した。このDIG標識合成オリゴRNAを用いてオリゴキャッピング反応を行った。ポリA RNA換算で0.2 μ gに相当する量のRNA (全RNAとして約10 μ g)に対し、24pmolのDIG標識合成オリゴRNAを用いた。RNAリガーゼ反応後、反応生成物をオリゴdTセルロースカラム、タイプII (コラボレイティブリサーチ社) にかけてポリA RNAを精製した。その全量をMOPSバッファー (20mM 3-モフフォリノプロパンスルホン酸 (MOPS) pH7.0, 5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA) を用いて18%(v/v)ホルムアルデヒド変性1.0%(w/w)アガロースゲル電気泳動を行った。これを20 x SSCバッファー (3.6M 塩化ナトリウム、0.3M クエン酸ナトリウム pH7.0) を用いてキャピラリートランスファー法によりプラスチャージナイロン膜 (ベーリンガー・マンハイム社) にブロッティングした後、ストラタジーンUVクロスリンカーを用いてUVクロスリンクを行った。こうして作製したフィルター上で、DIG発光検出キット (ベーリンガー・マンハイム社) を用い、オリゴキャッピング反応生成物、すなわちDIG標識合成オリゴRNAが結合したRNA分子及び未反応の合成オリゴRNA分子の検出を行った。図2に一例を示したように、DIG標識合成オリゴRNAを用いて合成オリゴRNA連結反応を行うことにより、高分子量化したオリゴキャッピング反応生成物を高感度に検出することができた。

このことにより、オリゴキャッピング反応の際の各段階の反応の進行状態やRNAの状態を比較的容易に評価できるようになった。

【0032】

【実施例2】 RNAリガーゼ反応の最適化

ポリA RNAと細胞質全RNAを基質として、RNAリガーゼによるDIG標識合成オリゴRNAのRNA分子の5'リン酸末端への連結反応を行った。RNAリガーゼの反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」 (羊土社) pp.46-51」

に従った。ポリA RNAを出発材料とした場合には、10 μ gの細胞質全RNAからオリゴdTセルロースカラムタイプII（コラボレイティブリサーチ社）で精製したポリA RNAとして24 pmolのDIG標識したオリゴキャップリンカーを連結した。細胞質全RNAを出発材料とした場合には、10 μ gの細胞質全RNAを基質とし、24 pmolのDIG標識したオリゴキャップリンカーを連結した後、オリゴdTセルロースカラムタイプIIを用いてポリAセクションを行いポリA RNAを精製した。図2に示したように、DIG標識合成オリゴRNAを用いてオリゴキャップリンカー連結反応を行った結果、高分子量化したオリゴキャッピング反応生成物を検出することができた。この結果から、全RNAの状態で行った場合でも、効率よくRNAの5'-リン酸末端に合成オリゴRNAを連結することが可能であることが明らかとなった。またポリA RNAを基質にした場合には、全RNAを基質にした場合に比べて標識された反応生成物の分子量が明らかに小さくなっていた。このことから、RNA リガーゼの反応中にもRNAの分解は起きていること、さらに全RNAの状態で行ったRNAリガーゼ反応を行うことにより、ポリA RNAを基質とした場合に比べて、RNAリガーゼ反応中のmRNA分子の分解が抑えられることが明らかとなった。

【0033】

【実施例3】 BAP反応条件の最適化

細胞質全RNAを基質としてBAP処理を行った後、RNAリガーゼを用いてDIG標識合成オリゴRNAを付加した。BAP処理の反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫（1996）「cDNAクローニング」（羊土社）pp.46-51」に従った。）DIG標識合成オリゴRNA連結後、polyAセクションを行い、ポリA RNAを精製した。

図3に示したように、細胞質全RNAを基質とした場合でも、RNAの5'リン酸末端の脱リン酸化が行われ、高分子量画分に検出されるDIG標識されたオリゴキャッピング反応生成物が減少した。また、全RNAを基質にした場合には、BAP反応中におけるRNAの分解によると思われる低分子量化は認められなかった（図4）。

【0034】

【実施例4】 タバコ培養細胞からのTAPの精製

オリゴキャップ法の反応過程においては、TAPを用いた脱キャップ反応の間に最も顕著なRNA分解が起きており、これがライブラリーの全長率を低下させる最

大の要因となっているものと考えられた。そこで、種々の市販の入手可能なTAP標品の比較検討を行ったが、十分にRNA分解活性が低いTAP標品を得ることができなかった。そこでタバコBY2細胞を培養し、RNA分解活性の低いTAP酵素の精製を行った。

TAPの精製はShinshiらが記載した方法(H. Shinshi et al. (1976) *Biochemistry* 15: 2185-2190)を一部改変して行った。タバコBY2細胞を、MS培地(シグマ)を用い、暗条件、28℃で10日間、振盪培養した。得られた細胞を破碎後、硫酸アンモニウム沈殿させ、DEAE-セルロースSHカラム(和光純薬社)、ホスホセルロースP11カラム(ワットマン社)、CM-セファロースCL-6Bカラム(ファルマシア社)及びセファデックスG200カラム(ファルマシア社)を用いてTAP酵素を精製した。TAP活性は、セファデックスG200カラムクロマトグラムで明らかに分離される2つの活性画分、高分子量画分と低分子量画分が認められた。低分子量画分はさらにDEAE-セルロースSHカラムで分離される2つの活性画分に分かれた。いずれのフラクションにおいても脱キャップ活性が認められ、その差はほとんど認められなかった。

TAP活性は、1.5mM チミジン-5'-モノホスフェートパラニトロエステル(pNT、SIGMA社)を基質として30℃で反応させた後、終濃度66mMとなるように水酸化ナトリウム溶液を添加して反応を停止させ、生成したパラニトロフェノールの量を400nmでの吸光度を調べることにより測定した。酵素活性はチミジン-5'-モノホスフェートパラニトロエステルから1分間に1 μ molのパラニトロフェノールを生成する酵素量を1Uとした。パラニトロフェノールの分子吸光係数は18000として計算した。

【0035】

〔実施例5〕 TAP反応の至適化

Shinshiらによれば、TAPの反応至適pHはNAD⁺を基質とした場合にはpH5.3、pNTを基質とした場合にはpH6.0と報告されている(H. Shinshi et al. (1976) *Biochemistry* 15: 2185-2190)。市販されているTAP酵素のサプライヤーがプロトコールで示している条件では、多くの場合、pH5.5~6.0の範囲の条件で行っており、先に菅野らが報告したオリゴキャップ法のプロトコールにおいても、TAP反応はp

H5.5で行っていた (K.Maruyama and S.Sugano. (1994) Gene 138:171-174、Y.Suzuki et al. (1997) Gene 200:149-156、丸山和夫、菅野純夫「オリゴキャップ法とPCRを用いる全長cDNAライブラリーの作製」、丸山和夫、菅野純夫「オリゴキャップ置換によるmRNAの5'末端クローニング」実験医学vol.11, No.18,p2491-2495、鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」羊土社 pp.46-51、S.Kato et al. (1994) Gene 150:243-250、Tabbaco acid phosphatase添付説明書(和光純薬)、Tabbaco acid phosphatase添付説明書(Epicentre社))。今回精製したTAP活性フラクションの反応pHによる影響を調べたところ、1.5mMのpNTを基質とした場合、フラクションA、フラクションB、フラクションCともpH5.5~6.9で強いTAP活性を示した。pNTを基質とした場合の至適pHはフラクションAでpH5.7 (図5)、フラクションBでpH6.5 (図6)、フラクションCでpH6.0 (図7) だった。

次に、TAP反応時におけるRNA分解のpHによる影響を調べた。20 μ gの細胞質RNAにpH5.5~pH6.9に調整したTAPバッファーとフラクションBのTAP酵素を加えて37℃16時間保温し、その間のRNAの分解の様子を調べた。その結果、pH6.0以下ではRNAの分解が認められた (図8)。また、フラクションAとフラクションBのTAP酵素を用い、RNAを基質とした際の脱キャップ反応時におけるpHの影響を調べた。細胞質全RNAを基質としてBAP処理を行った後、pH5.5~6.9の範囲に調整した酢酸ナトリウムバッファーに溶解し、37℃で1時間反応を行った。TAP反応後、RNAリガーゼを用いてDIG標識した合成オリゴRNAを連結させ、反応生成物を解析した。また、DIG標識された反応精製物を調べたところ、pH6.5でTAP処理を行った場合に最も効率的にmRNAが脱キャップされることが明らかとなった (図9)。デンストメーターを用いて調べたところ、pH6.5での脱キャップ活性は従来の反応条件であるpH5.5に比べて3倍以上だった。以上の結果から、pH6.5で脱キャップ反応を行うことにより、作製されるライブラリーの全長率、クローンタイターとも改善されることが期待された。

【0036】

〔実施例6〕 改良したプロトコールによるオリゴキャッピング反応の評価
NT2細胞から抽出した5~100 μ gの細胞質全RNAを出発材料として、オリゴキャ

ッピング反応を行った。得られた反応生成物を鋳型とし、オリゴdTアダプタープライマー FL3-705 (配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TTT TT TTT TTT -3' / 配列番号: 2) をプライマーとして、第一鎖cDNAを合成した。オリゴキャッピングしたmRNA標品を最終容量が25 μ lとなるように第一鎖cDNA合成バッファー (ライフテクノロジー社、50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、75mM 塩化カリウム、3mM 塩化マグネシウム、0.8mM dNTP、12mM ジチオスレイトール、0.5 μ l RNase阻害剤) に溶解し、5 pmolのオリゴdTアダプタープライマー FL3-705と200Uのスーパースク립トII (ライフテクノロジー社) を加えて16℃で1時間保温後、さらに42℃で1時間反応させた。これに25 μ lのH₂Oを加え、フェノールクロロホルム処理した後、7.5 μ lの0.1N NaOHと1 μ lの0.5M EDTAを加えて65℃で60分保温し、RNA鎖を分解した。これをフェノールクロロホルム処理、エタ沈後、50 μ lのTEバッファー (pH8.0) に溶解した。その他の反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」 (羊土社) pp.46-51」に従った。

このようにして作製した第一鎖cDNAを鋳型に使い、オリゴキャップリンカープライマー FL3-666 (配列 5'-AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG -3' / 配列番号: 3) とEF1 α プライマー EF1-1R (配列 5'-TGC TAC TGT GTC GGG GTT GTA-3' / 配列番号: 4)、あるいはEF1 α プライマー EF1-3F (配列 5'-CCT GAA CCA TCC AGG CCA AAT-3' / 配列番号: 5) とオリゴdTアダプタープライマー FL3-705 (配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT -3' / 配列番号: 2) を用いてPCRを行った。このPCRでは、それぞれEF1 α 遺伝子の5'末端断片650塩基と3'末端断片644塩基の断片が増幅される。第一鎖cDNAの1/40量 (1.25 μ l) を反応容量が25 μ lとなるようにPCRバッファー (10mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、50mM 塩化カリウム、1.5mM 塩化マグネシウム、0.2mM dNTP) に溶解し、各々2.5 pmolずつのプライマーと2.5UのTakara Taq (宝酒造) を加えて反応を行った。反応はパーキンエルマーモデル9600を用い、95℃ 5分保温後、95℃ 30秒、52℃ 1分、72℃ 1分の条件で17ないし22サイクル反応を行った。PCR終了後、その1/5量 (5 μ l) をTBEバッファー (45mM トリスほう酸緩衝液、2mM EDTA pH8.0) を用いて2.0%(w/w)アガロースゲル電気泳動を行い、各断片の増幅を調べた。その他の反応条件は、文献「鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNAクローニング」 (羊土

社) pp.46-51」に従った。)

100~20 μ gのRNAを用いた場合には、17サイクルのPCRで、5'末端側で増幅された断片と3'末端側で増幅された断片がほぼ1:1の比率で検出された(図10)。この結果から、ほぼ100%に近い状態で完全長mRNAの5'末端にオリゴキャップされていることが示唆された。また、5 μ gの細胞質全RNAを用いて行った場合でも、17サイクルのPCRで5'末端にオリゴキャップリンカーが付加されたEF1 α mRNAに対する第一鎖cDNAから増幅された断片をはっきりと検出することができた。

【0037】

【実施例7】 オリゴキャップcDNAライブラリーの作製

NT2細胞、SK-N-MC細胞、H4細胞を培養し、Maniatisが記載した方法(Sambrook, J. et al. "Molecular cloning, a laboratory manual/ second edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 Chapter 8.3.)にしたがって細胞質全RNAを抽出した。

また、クローンテック社よりヒト副腎(64016-1)、ヒト全脳(64020-1)、ヒト肝臓(64022-1)、ヒト脾臓(64034-1)、ヒト胸腺(64028-1)、ヒト気管(64091-1)の全RNAを購入した。NT2細胞では100 μ g、50 μ g、5 μ gの細胞質全RNA、それ以外では100 μ gの細胞質全RNAを用いた。以下には、100 μ gの細胞質全RNAを出発材料としてオリゴキャップcDNAライブラリーを作製した場合のプロトコールを示した。尚、出発材料が50 μ g及び5 μ gの細胞質全RNAの場合には、すべての反応容量を1/2、1/20にして行った。

100 μ gの細胞質全RNAを反応容量が200 μ lとなるようにBAPバッファー(0.1M トリス塩酸緩衝液pH7.0、10mM 2-メルカプトエタノール、216U RNase阻害剤(プロメガ社))に溶解し、5UのBAP(RNaseフリー、宝酒造社)を加えて37℃、60分間反応させた。これをフェノールクロロホルム処理し、エタ沈後、反応容量が100 μ lとなるようにTAPバッファー(50mM 酢酸ナトリウムpH6.5、1mM EDTA、10mM 2-メルカプトエタノール、108U RNase阻害剤(プロメガ社))に溶解した。これに、タバコ細胞から精製したTAP酵素1Uを添加し、37℃で60分間反応させた。これをフェノールクロロホルム処理し、エタ沈後、反応容量が300 μ lとなるようにRNAリガーゼバッファー(50mM トリス塩酸緩衝液pH7.0、10mM 2-メルカプトエタ

ノール、5mM MgCl_2 、0.5mM ATP、300U RNase阻害剤（プロメガ社）、25% ポリエチレングリコール8000）に溶解し、120 pmolの合成オリゴRNA KM-02（配列 5'-AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UGG -3'／配列番号：1）と525UのRNAリガーゼ（RNaseフリー、宝酒造）を加えて、20℃で3時間反応させた。さらにこれに600 μl の H_2O を加え、フェノールクロロホルム処理とエタ沈を行った。ついでこれを2mlのカラムローディングバッファー（20mM トリス塩酸緩衝液 pH7.6、0.1M塩化ナトリウム、1mM EDTA、0.05% N-ザルコシン酸ナトリウム）に溶解し、カラムローディングバッファーで平衡化したオリゴdTセルロースカラムタイプII（コラボレイティブリサーチ社）を通し、4.5mlのカラムローディングバッファーで洗浄後、900 μl の溶出バッファー（10mM トリス塩酸緩衝液 pH7.6、1mM EDTA、0.05% SDS）で溶出し、オリゴキャップされたポリA RNAフラクションを回収した。

【0038】

上述のようにしてオリゴキャッピングしたmRNAの全量（約1 μg ）を反応容量が25 μl となるように第一鎖cDNA合成バッファー（50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.3、75mM塩化カリウム、3mM塩化マグネシウム、12mM ジチオスレイトール、各0.8mM dNTP 混合用液）に溶解し、5 pmolのオリゴdTアダプタープライマー FL3-705（配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'／配列番号：2）を加えて200U のスーパースクリプト II（ライフテクノロジー社）を加えて16℃で1時間反応後、さらに42℃で1時間反応させた。これに等量の H_2O を加え、フェノールクロロホルム処理を行い、7.5 μl の0.1N水酸化ナトリウム溶液と1 μl の0.5M EDTAを加え、65℃で60分保温した。その後、10 μl の1M トリス塩酸緩衝液 pH7.8を加え、さらに35 μl の7.5M酢酸アンモニウムと250 μl のエタノールを加えてエタ沈を行い、得られた沈殿を50 μl のTEバッファー（pH8.0）に溶解した。この第一鎖cDNAの1/5量（10 μl ）を鋳型として、オリゴキャップリンカープライマー FL3-666（配列 5'-AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG -3'／配列番号：3）とオリゴdTアダプタープライマー FL3-705（配列 5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'／配列番号：2）を用いて高忠実度長鎖PCRを行った。PCRはジーンアンプXL PCRキット（パーキンエルマー社）を

用い、容量100 μ lの系でプライマーをそれぞれ8 pmolずつを添加して行った。反応はパーキンエルマーモデル9600を用い、95℃ 5分保温後、95℃ 1分、58℃ 1分、72℃ 10分の温度条件で15サイクル行った。得られた反応生成物のフェノールクロロホルム処理とエタ沈を行った後、全量を100 μ lの牛血清アルブミンを加えたNEBバッファ-2（ニューイングランドバイオラボ社、10mM トリス塩酸緩衝液 pH7.9、10mM 塩化マグネシウム、50mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1 mg/ml(w/v) 牛血清アルブミン）に溶解し、40UのSfiI（ニューイングランドバイオラボ社）を添加して、50℃で3.5時間反応させて5'末端のオリゴキャップリンカー及び3'末端のオリゴdTアダプター内にデザインしてあるSfiI配列の切断を行った。フェノールクロロホルム処理、エタ沈を行った後アガロースゲル電気泳動により1kb以上の断片をジーンクリーン（パイオ101）を用いて回収した。この1/2量に約50ngのDraIIIで切断したクローニングベクターpME18SFL3を加え、DNAライゲーションキットバージョン1（宝酒造）を用いて、反応容量30 μ lで、16℃で15時間反応させた。

【0039】

【実施例8】 作製したcDNAライブラリーの完全長率の評価

作製したcDNAライブラリーの一部を大腸菌DH10B株にバイオラドE. coliパルサーを用いてエレクトロポレーションし、形質転換体を得た。100 μ gの全RNAをオリゴキャップし、15サイクルPCRを行って作製したライブラリーでは、用いたRNA（50ないし100 μ gの細胞質全RNA）に換算して約80万～330万クロンの形質転換体を得られた（表1）。これらの形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB培地で37℃で一晩振盪培養後、クラボウ自動プラスミド抽出機PIシグマ1000を用いてプラスミドDNAを抽出した。これらのプラスミドクロンのcDNAの5'末端からのシングルパス配列を、ABI ビッグダイターミネーターキットを用い、ABI PRISM 377 DNA自動シーケンサーで決定した。これらの配列を、ワシントン大学のBlast 2.0を用いてGenBankデータベースに対する相同性検索を行った。GenBankの既知のmRNAと同一遺伝子に由来すると判断されたクロンの5'末端配列をGenBank中の配列と比較することにより、そのクロンの5'末端が完全長であるかどうかを評価した。すなわち、得られたクロンの5'末端がGenBankの配列より長い場

合には「5'末端全長クローン」とした。GenBankの配列の翻訳開始コドンを含む場合には「翻訳開始点全長クローン」、含まない場合には「不完全長クローン」とした。便宜的に、(翻訳開始点全長クローン)/(翻訳開始点全長クローン + 不完全長クローン)をそのcDNAライブラリーの完全長率(全長クローンの比率)とした。

100 μ gないし50 μ gの細胞質全RNA(ポリA RNA換算でそれぞれ約1 μ gと約2 μ g)を用いてライブラリーを作製した場合、翻訳開始コドンを含む「翻訳開始点全長クローン」をあわせたcDNAライブラリーの完全長率は、89~99%程度であった(表1、表2)。

【0040】

【表 1】

改良プロトコルで作製したオリゴキヤップ cDNA ライブラリーの完全長率の評価 (培養細胞 RNA より)									
RNA が由来する細胞	NT2	NT2	NT2	NT2	NT2	NT2	SK-N-MC	H4	
全 RNA (μg)	100	100	100	50	5	100	100	100	
PCR サイクル数	15	10	5	15	15	15	15	15	
単離されたクローン数	3.3 X 10 ⁴	1.0 X 10 ⁴	8.5 X 10 ⁴	1.6 X 10 ⁴	2.5 X 10 ⁴	8.0 X 10 ⁴	1.2 X 10 ⁴		
シーケンシングしたクローン数	192	192	192	192	192	192	192	192	
シーケンシングが決定されたクローン数	174	182	121	178	189	187	184	184	
既知の mRNA ヒット数	67	59	52	74	70	66	70	70	
5'-末端全長クローン数	54	47	42	55	54	47	54	54	
翻訳開始点全長クローン数	66	55	50	66	65	59	68	68	
不完全長クローン数	1	4	2	8	5	7	2	2	
翻訳開始点全長クローンの比率	98.5%	93.2%	89.2%	96.2%	92.9%	89.4%	97.1%		

【0041】

【表 2】

改良プロトコルで作製したオリゴキャップ cDNA ライブラリーの完全長率の評価 (市販ヒト組織 RNA より)						
RNA が由来する細胞	副腎	全脳	肝臓	脾臓	胸腺	気管
全 RNA (μg)	100	100	100	100	100	100
PCR サイクル数	15	15	15	15	15	15
シークエンسしたクローン数	192	192	192	192	192	192
シークエンスが決定されたクローン数	184	183	189	182	185	187
既知の mRNA ヒット数	79	68	70	57	60	62
5'-末端全長クローン数	63	54	59	44	43	54
翻訳開始点全長クローン数	71	64	68	51	54	59
不完全全長クローン数	8	4	2	6	6	3
翻訳開始点全長クローンの比率	89.9%	94.1%	97.1%	89.5%	90.0%	95.2%

【0042】

この値は、従来の方法でより多くの生体試料から作製したオリゴキャップ cDNA ライブラリーを解析して得られた結果の60～75% (T. Ota et al. (1998) Microbial and comparative genomics 3:C-87) に比べて、きわめて高かった。以上の結

果から、本研究で改善したプロトコルでは、従来のプロトコルで作製した場合に比べて完全長率が高く、またより少ないRNA試料からも完全長率の高いcDNAライブラリーを作製できることが示された。

また、従来、分解が進んだRNA分子が含まれているため完全長cDNAライブラリー構築のための材料としては適さないとされていた、組織由来の市販のRNA標品を出発材料として用いても、高品質の完全長ライブラリーができることが明らかになった。

【0043】

【実施例9】 第2鎖cDNA合成のPCR回数を減らした場合のクローンタイター数 100 μ gのNT2細胞由来の全RNAをオリゴキャップし、10及び5サイクルPCRを行ってcDNAライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーの一部を大腸菌DH10B株にバイオラドE. coliパルサーを用いてエレクトロポレーションし、形質転換体を得た。その結果、100 μ gの細胞質全RNAに換算してそれぞれ100万クローン、8万5千クロンの形質転換体を得られた。

【0044】

【発明の効果】

本発明により、従来のオリゴキャップ方法で完全長率の低下の大きな原因となっていた反応中におけるmRNAの分解を顕著に抑制することが可能となった。これにより、従来の方法で作製したcDNAライブラリーと比べて、cDNAライブラリーの完全長率を著しく上昇させることができた。本発明者らによる解析では、従来の方法で作製したオリゴキャップライブラリーの完全長率は約60～75%であったが、本発明の方法で作製したcDNAライブラリーでは、従来の方法に用いていた量の1/5～1/100量の出発材料しか使わなかった場合でも、約89～99%と極めて高い完全長率のcDNAライブラリーを作製できた。

【0045】

また、本発明の方法においては、酸性ピロフオスファターゼ反応時のpH条件を変更することにより、CAP構造を有するmRNAの脱キャップ反応の効率を3倍以上に上昇させることができ、cDNAライブラリーを作製した際の完全長cDNAとして得られるクローンタイターを飛躍的に上昇させることができた。これにより、より少

ない材料からも多くのクローンタイターが得られるオリゴキャップライブラリーの作製が可能になった。本発明の方法によれば、poly A RNA量で換算で、従来の方法で用いていた量のわずか1/10のRNAからライブラリーを作製した場合でも、100万クローンを越える十分な数の形質転換体を得ることができる。

【0046】

オリゴキャップ法では、cDNAライブラリーの作製の段階でポリメラーゼ連鎖反応を行っていることが問題点の一つとして指摘されている。ポリメラーゼ連鎖反応では、試験管内でのDNA複製の間に人為的な変異が導入されることや、特異的な断片、特に長さの短い断片が優先して増幅されることによって生じるバイアスなどが危惧されている。本発明の方法においては、従来法からのタバコ酸性ピロフوسفターゼ反応の条件の変更により、オリゴキャッピング効率が上昇したことで、cDNAライブラリー作製の段階におけるポリメラーゼ連鎖反応の回数を減らし、こうした問題点を低減させることも可能になった。実際、従来の方法の1/10量のRNAからライブラリーを作製した場合、PCRのサイクル数を5サイクルまで減らしても、約8万5千クローンを得ることができた。

【0047】

本発明で示した完全長cDNAライブラリー作製法では、従来、きわめて困難とされていた少ないRNA試料から完全長率の高いcDNAライブラリーを作製することが可能となったが、このことは、ゲノム解析で明らかにされてくる大量の遺伝子の機能を明らかにするための学術研究分野、あるいは産業上有用な遺伝子の完全長cDNAを効率良く取得していく目的、さらにはこうした学術研究や産業化研究活動を支援するための完全長cDNAライブラリー作製用キットの開発、あるいは遺伝子リソースとしての高品質のcDNAライブラリーの商業的供給において、本発明が極めて重要な基盤技術となることを示している。

【0048】

また、本発明により、上記本発明の方法により作製されたcDNAを利用して、ゲノム上のプロモーターを含む転写制御領域を単離する方法が提供された。2000年春にはヒトゲノムの90%以上をカバーするラフドラフト（精度が少し低いヒトゲノム配列解析）が完了し、さらに、2003年までにはヒト全ゲノム配列解析が完了

する計画になっている。長いイントロンの存在するヒトゲノムより転写開始点を解析ソフトで解析することはかなり困難がともなう。しかしながら、本発明のcDNAライブラリー作製法を用いれば、全長cDNAの5'-端配列からゲノム配列上でのmRNA転写開始点が容易に特定できるため、転写開始点上流配列の中に含まれるプロモーターを含む転写制御に関わるゲノム領域を取得することが容易になる。

【0049】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Methods of construction of full length cDNA libraries

<130> H1-102

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized RNA Sequence

<400> 1

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

tgctactgtg tcggggttgt a

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

cctgaaccat ccaggccaaa t

21

【図面の簡単な説明】

【図 1】

オリゴキャップ法の原理を示す図である。

【図 2】

ポリ A RNAと全RNAを基質としたときのRNAライゲーション反応の比較を示す図である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 10 μ g の細胞質全 RNA から精製したポリ A RNA を 25 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

レーン 2 : 10 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

レーン 3 : 10 μ g の細胞質全 RNA を 300 μ l の反応系で 24 pmol の DIG 標識したオリゴ RNA と連結して泳動したもの

【図 3】

細胞質全 RNA を BAP 酵素量を変えて脱リン酸化反応させた後、DIG 標識したオリゴ RNA と連結した結果を比較した図である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 150 μ l の反応系で 3.75U の BAP を用いて 37℃ 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 5.0U の BAP を用いて 37℃ 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 250 μ l の反応系で 6.25U の BAP を用いて 37℃ 1 時間反応させた後、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理せずに、300 μ l の反応系で DIG 標識したオリゴ RNA と連結し、その 1/10 量を泳動したもの

【図 4】

細胞質全 RNA を BAP 酵素量を変えて脱リン酸化反応させた後の RNA の状態を比較した図である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 20 μ g の細胞質全 RNA を泳動したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 150 μ l の反応系で 3.75U の BAP を用いて 37℃ 1 時間反応させた後、その 2/5 量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全 RNA を 200 μ l の反応系で 5.0U の BAP を用いて 37℃ 1

時間反応させた後、その2/5量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 5 : 100 μ g の細胞質全RNAを250 μ l の反応系で6.25UのBAPを用いて37℃1時間反応させた後、その2/5量をアガロースゲル電気泳動したもの

レーン 6 : 100 μ g の細胞質全RNAをBAPバッファー中で37℃1時間保温した後、その2/5量をアガロースゲル電気泳動したもの

【図 5】

1.5mMのpNTを基質とした場合のフラクションAのTAP酵素活性のpH依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かったpHの活性を100%として、相対活性で示した。

【図 6】

1.5mMのpNTを基質とした場合のフラクションBのTAP酵素活性のpH依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かったpHの活性を100%として、相対活性で示した。

【図 7】

1.5mMのpNTを基質とした場合のフラクションCのTAP酵素活性のpH依存性を示した図である。酵素活性のもっとも高かったpHの活性を100%として、相対活性で示した。

【図 8】

TAP活性フラクションBのRNA分解活性のpH依存性を示した図である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 20 μ g の細胞質RNA

レーン 3 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクションB酵素2.0UとpH5.5に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 4 : 20 μ g の細胞質RNAにpH5.5に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 5 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクションB酵素2.0UとpH5.7に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 6 : 20 μ g の細胞質RNAにpH5.7に調整したTAPバッファーを加えて37℃1

6時間保温したもの

レーン 7 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクシオン B 酵素2.0UとpH6.1に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 8 : 20 μ g の細胞質RNAにpH6.1に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 9 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクシオン B 酵素2.0UとpH6.5に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 1 0 : 20 μ g の細胞質RNAにpH6.5に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 1 1 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクシオン B 酵素2.0UとpH6.8に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 1 2 : 20 μ g の細胞質RNAにpH6.8に調整したTAPバッファーを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 1 3 : 20 μ g の細胞質RNAにフラクシオン B 酵素2.0Uのみを加えて37℃16時間保温したもの

レーン 1 4 : 20 μ g の細胞質RNAのみで37℃16時間保温したもの

【図 9】

細胞質全RNAをBAP処理後、反応pHを変えてTAPによる脱キャップ反応を行った後、DIG標識したオリゴRNAと連結した結果を比較した図である。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全RNAをBAP処理し、フラクシオン B 酵素を用いてpH 5.5に調整したTAPバッファーで脱キャップ反応を行い、DIG標識したオリゴRNAと連結したもの

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全RNAをBAP処理し、フラクシオン B 酵素を用いてpH 5.7に調整したTAPバッファーで脱キャップ反応を行い、DIG標識したオリゴRNAと連結したもの

レーン 4 : 100 μ g の細胞質全RNAをBAP処理し、フラクシオン B 酵素を用いてpH 6.0に調整したTAPバッファーで脱キャップ反応を行い、DIG標識したオリゴRNAと

連結したもの

レーン 5 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシオン B 酵素を用いて pH 6.5 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

レーン 6 : 100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシオン B 酵素を用いて pH 6.8 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行い、DIG 標識したオリゴ RNA と連結したもの

【図 10】

少量の RNA 試料でオリゴキャップ反応を行った結果を示した図である。5~100 μ g の細胞質全 RNA を BAP 処理し、フラクシオン B 酵素を用いて pH 6.5 に調整した TAP バッファーで脱キャップ反応を行った後、オリゴ RNA と連結し、これを鋳型にオリゴ dT アダプターをプライマーとして第 1 鎖 cDNA を合成した。これを鋳型としてプライマー FL3-666 (配列番号 : 3) とプライマー EF1-1R (配列番号 : 4) の組み合わせ、及びプライマー EF1-3F (配列番号 : 5) とプライマー FL3-705 (配列番号 : 2) の組み合わせで、それぞれ EF1 α の 5' 末端領域及び 3' 末端領域を PCR により増幅を行い、アガロースゲル電気泳動を行った。各レーンのサンプルの説明を以下に記した。増幅した EF1 α の 5' 末端 650 塩基の断片と 3' 末端 644 塩基の断片の位置を矢印で示した。

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 100 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 3 : 100 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 4 : 20 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

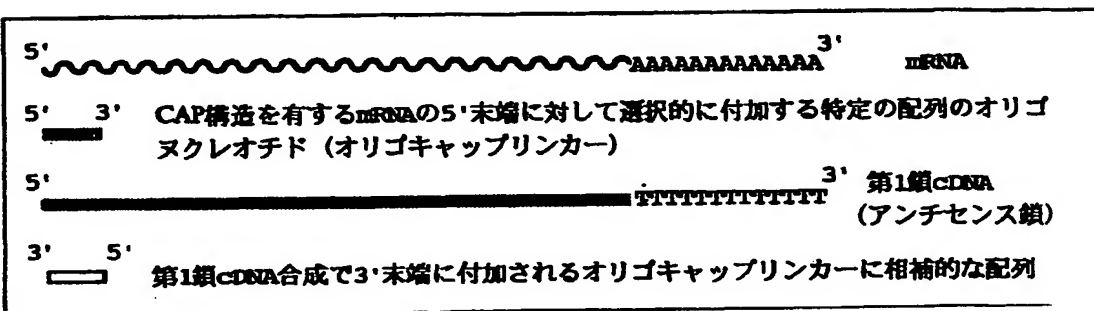
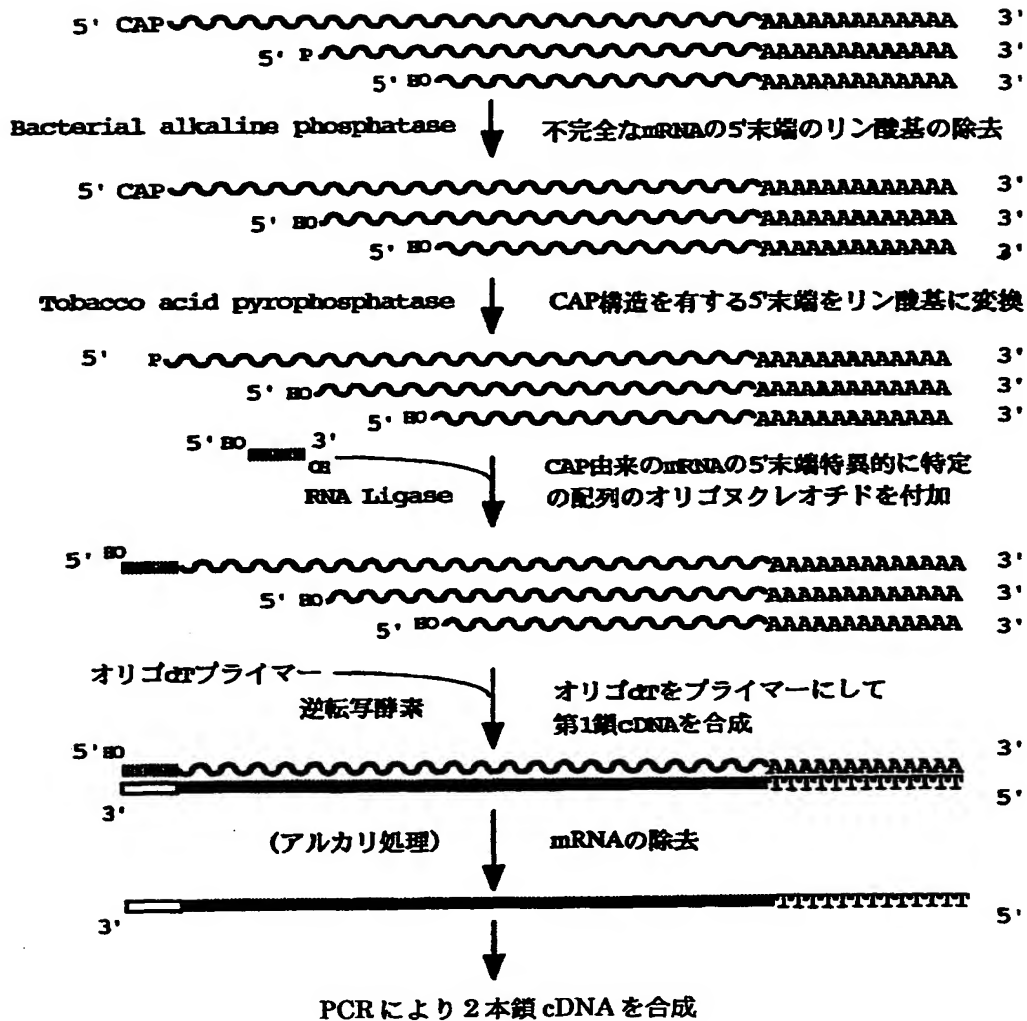
レーン 5 : 20 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

レーン 6 : 5 μ g の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリーで、EF1 α の 5' 末端領域の増幅を行ったもの。

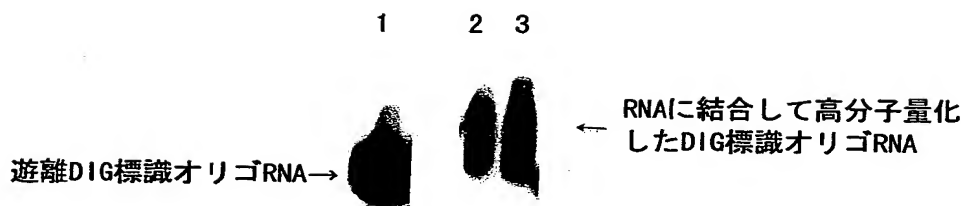
レーン 7 : $5\mu g$ の細胞質全 RNA を用いて作製したオリゴキャップライブラリー
で、EF1 α の 3' 末端領域の増幅を行ったもの。

【書類名】 図面

【図1】



【図 2】



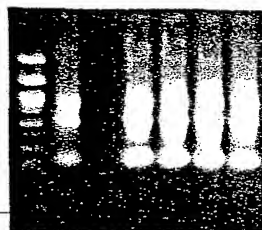
【図 3】

1 2 3 4

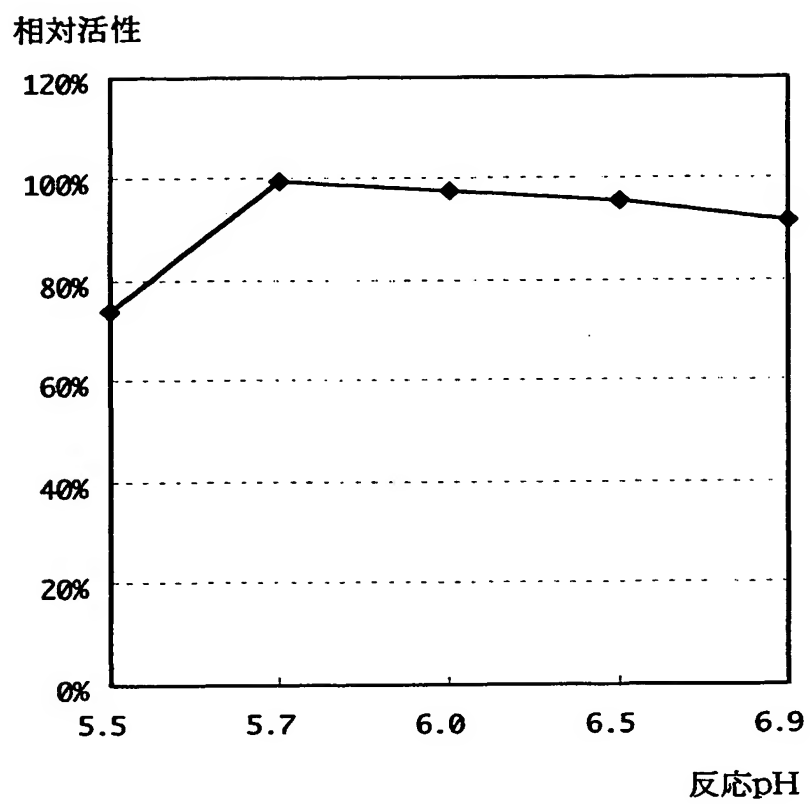


【図 4】

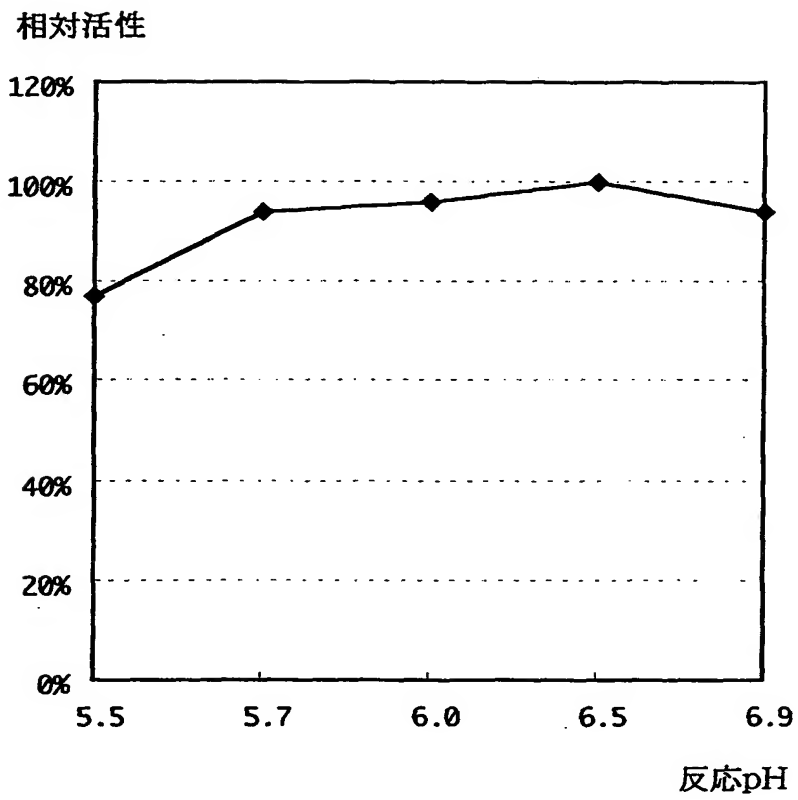
1 2 3 4 5 6



【図 5】

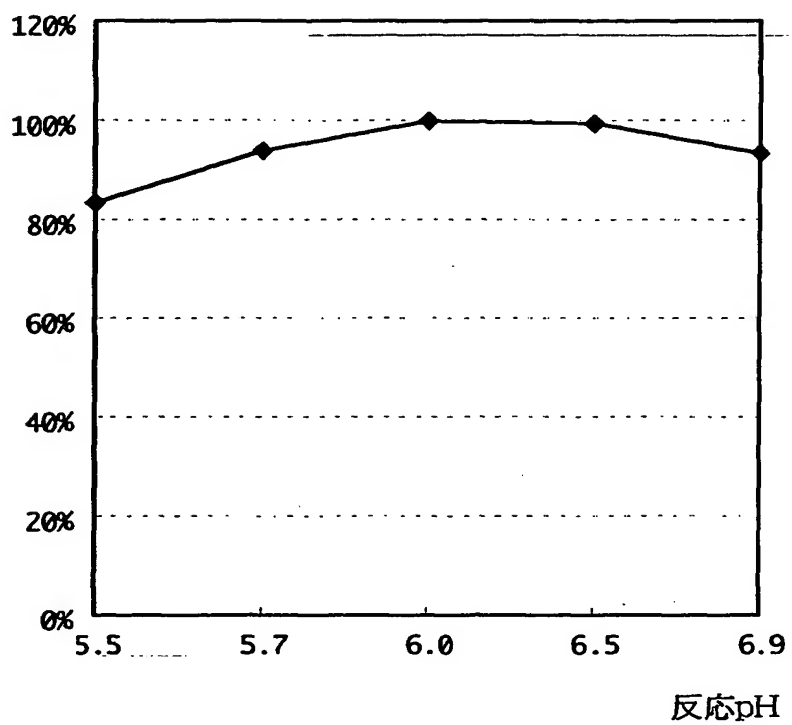


【図 6】

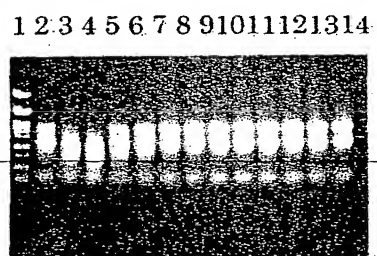


【図 7】

相对活性



【図 8】

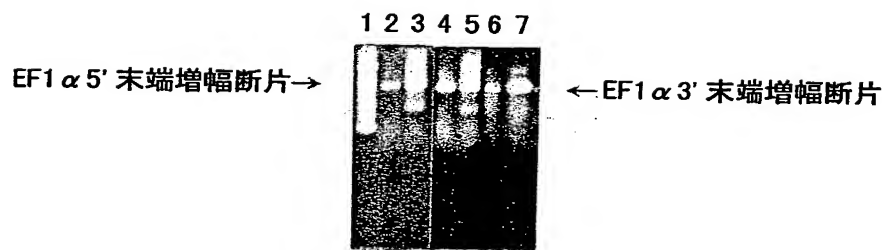


【図 9】

1 2 3 4 5 6



【図 1 0】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少ないRNA試料を出発材料とした場合でも完全長率の高いcDNAライブラリーを作製しうる方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 従来のオリゴキャップ法における、アルカリ性ホスファターゼ反応、酸性ピロホスファターゼ反応、およびRNAリガーゼ反応の各段階の反応条件の至適化を図り、従来の方法に比べてはるかに少ない量の出発材料からでも非常に高い完全長率のcDNAライブラリーを作製しうる方法の開発に成功した。

【選択図】 なし

特平11-195104

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597059742]

1. 変更年月日 1997年 4月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県木更津市矢那1532番地3

氏 名 株式会社ヘリックス研究所